

# 嗜热藻 BP-1 中几个蓝细菌光敏色素结构域体内重组及光化学性质研究

刘冰冰<sup>1</sup>, 陈 煜<sup>2</sup>, 邓明刚<sup>3</sup>, 赵开弘<sup>3</sup>, 周 明<sup>3\*</sup>

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中科技大学环境科学与工程学院, 武汉 430074;  
3. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 通过蛋白质序列同源性比对分析, 在嗜热藻 (*Thermosynechococcus elongatus* BP-1) 里面找到了与已知的 Pb/Pg 型蓝细菌光敏色素 TePixJ 和 TeTlr0924 同源的 3 个基因 *tlr0911*、*tlr1215* 和 *tlr1999*。通过分子克隆技术把它们的 GAF 结构域分别构建在 pET30a(+) 表达载体上, 与可生成藻蓝胆素 (PCB) 的质粒 pACYCDuet-ho1-pcyA 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 体内重组, 生成重组蛋白, 利用亲和层析柱分离纯化, 纯化后的蛋白质经过锌荧光和蛋白质酸性尿素变性以及荧光光谱和吸收光谱等实验分析鉴定, 结果表明, Tlr0911-GAF 存在蓝光吸收态  $Pb_{406\text{ nm}}$  和绿光吸收态  $Pg_{527\text{ nm}}$  之间的可逆光转换, 它可共价结合两种藻胆色素, 即藻紫胆素 (PVB) 和藻蓝胆素 (PCB), Tlr1999-GAF 则存在蓝光吸收态  $Pb_{417\text{ nm}}$  和青光吸收态  $Pt_{496\text{ nm}}$  之间的可逆光转换, 它同样共价结合 PVB 和 PCB, 而 Tlr1215-GAF1 和 Tlr1215-GAF2 不能自发结合藻胆色素, 不具有光活性。

**关键词:** 蓝细菌光敏色素; 可逆光转换; 体内重组

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)02-0178-08

## Reconstitution *in vivo* and Photochemical Properties of Several Cyanobacteriochrome Domains from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

LIU Bing-Bing<sup>1</sup>, CHEN Yu<sup>2</sup>, DENG Ming-Gang<sup>3</sup>, ZHAO Kai-Hong<sup>3</sup>, ZHOU Ming<sup>3\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Environment Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;  
3. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** By protein sequence homology comparison with the Pb/Pg-type cyanobacteriochrome TePixJ and TeTlr0924, three homologous genes *tlr0911*, *tlr1215* and *tlr1999* from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 were found. By molecular cloning techniques, the GAF domains of those genes were cloned into expression vector pET30a(+), respectively. The *E. coli* strain BL21 (DE3) harboring the expression plasmid and the pACYCDuet-ho1-pcyA plasmid for phycocyanobilin (PCB) were induced to generate recombinant proteins. The expressed proteins (His)<sub>6</sub> tagged at the N-terminus were purified with nickel-affinity His-Trap chelating column. The purified proteins were identified with zinc-induced fluorescence, acidic urea denaturation, fluorescence and absorption spectrum. Results showed that Tlr0911-GAF contained two covalently bound bilin chromophores, phycoviolobilin (PVB) and phycocyanobilin (PCB), and exhibited reversible photoconversion between a blue-absorbing form at 406 nm ( $Pb_{406\text{ nm}}$ ) and a green-absorbing form at 527 nm ( $Pg_{527\text{ nm}}$ ). Tlr1999-GAF was also covalently bound with PVB and PCB, and reversible photoconversion existed between a blue-

收稿日期: 2012-07-06, 修回日期: 2012-11-19。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21072068; 31110103912)。

作者简介: 刘冰冰(1987-), 女, 河南三门峡人, 硕士研究生, 主要从事蓝细菌光合作用和蛋白质工程研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zhouming321@126.com)。

absorbing form at 417 nm ( $Pb_{417\text{ nm}}$ ) and a teal-absorbing form at 496 nm ( $Pt_{496\text{ nm}}$ ). Neither Tlr1215-GAF1 nor Tlr1215-GAF2 could be spontaneously bound with bilin chromophore.

**Key words:** Cyanobacteriochrome; Reversible photoconversion; Assembly in *Escherichia coli*

植物光敏色素是一种光感受器,它是一种含有线性四吡咯生色团的水溶性蛋白质,存在两种不同的形态:红光吸收形态(Pr)和远红光吸收形态(Pfr)<sup>[1]</sup>。植物光敏色素的这两种光形态可以发生可逆光转换,它调节植物体内一系列的生理反应<sup>[2]</sup>。在细菌中也发现了与植物光敏色素相似的蛋白质<sup>[3]</sup>。

近年来更多的植物光敏色素的远缘族群已经被分离出来,蓝细菌光敏色素是一类最近被鉴定可以感受多种不同波长光线的光受体家族,它只存在于蓝细菌内<sup>[4]</sup>。植物光敏色素N-末端的光受体组件包括PAS(per/ARNT/sim)结构域,GAF(cGMP磷酸二酯酶/腺苷酸环化酶/FhlA蛋白)结构域和PHY(光敏色素亚结构域)结构域<sup>[5]</sup>。而蓝细菌光敏色素特殊光响应的发生只需要与植物光敏色素近缘的GAF结构域<sup>[6]</sup>。

蓝细菌光敏色素存在相当多变的光谱特性,它们的光谱变化几乎覆盖了近紫外和可见光区<sup>[4]</sup>。在体外,第一个被发现具有蓝光吸收态(Pb)和绿光吸收态(Pg)之间的可逆光转换的蓝细菌光敏色素是SyPixJ1,它是一个蓝光趋化调节子,随后Pb/Pg型的蓝细菌光敏色素开始被集中研究,例如SyPixJ1、TePixJ和TeTlr0924的研究<sup>[6-9]</sup>。这3种蛋白显示出一个新奇的处在Pb态(蓝光吸收峰在425~435 nm)和Pg态(绿光吸收峰在531~535 nm)之间的可逆光转换。同时蓝细菌光敏色素也可能涉及到昼夜节律和细胞聚集的光感应重新组合<sup>[10]</sup>。

本实验主要集中研究嗜热的嗜热藻(*Thermosynechococcus elongatus* BP-1),通过和已知的Pb/Pg型蓝细菌光敏色素TePixJ和TeTlr0924进行同源比对,找出了和它们具有同源性的两个可能的蓝细菌光敏色素Tlr0911和Tlr1999,而Tlr1215和这两个可能的蓝细菌光敏色素具有同源性。因此取这3个基因的GAF结构域在体外构建质粒,与可生成藻蓝胆素(PCB)的质粒pACYCDuet-ho1-pcyA在大肠杆菌体内重组,生成重组蛋白,然后通过荧光发射光谱、吸收光谱、SDS-PAGE等方法,对

重组蛋白的光化学特性和生物学特性进行分析鉴定。蓝细菌光敏色素的研究对了解光敏色素及光敏色素类似蛋白的进化关系有着重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株BL21(DE3)为本实验室保存;表达载体pET30a(+)、pACYCDuet-1购自Novagen公司;重组质粒pACYCDuet-ho1-pcyA由本实验室构建保存;DNA回收试剂盒、T4 DNA连接酶和限制性内切酶BamH I、EcoR I、Hind III、Sal I为MBI公司产品。Taq酶为Bio-star公司产品;IPTG是SIGMA公司产品;亲和层析介质购自Amersham Pharmaci公司。嗜热藻(*Thermosynechococcus elongatus* BP-1)由中国科学院化学研究所赵井泉老师赠予。引物合成以及测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

### 1.2 结构域分析

通过SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)确定Tlr0911、Tlr1215和Tlr1999这3个假定的蓝细菌光敏色素的结构域构成<sup>[11]</sup>。运用Clustal X 1.83软件对它们和TePixJ、TeTlr0924的同源性进行比对分析。

### 1.3 引物设计和合成

以嗜热藻(*T. elongatus* BP-1)基因组DNA序列为模板,设计克隆引物(见表1)。在上下游引物的

表1 本实验中设计的引物  
Table 1 Primers designed in this study

tlr0911-GAF	P3: 5'TCT <u>GGATCC</u> ACTCAAGCTGA <u>ACTC</u> 3'
	P4: 5'ATAGTC <u>GACTT</u> CC <u>TGT</u> GAGGAG <u>TTTG</u> 3'
tlr1215-GAF1	P5: 5'CC <u>CGAATT</u> CA <u>CTGT</u> GAGGAG <u>TTTG</u> 3'
	P6: 5'CG <u>CGTCGAC</u> CT <u>ACTT</u> CC <u>CACAA</u> CT <u>CTG</u> 3'
tlr1215-GAF2	P7: 5'CA <u>AGGATCCCGC</u> ATT <u>CGCCAA</u> CC <u>CTG</u> 3'
	P8: 5'CG <u>CGAGCTT</u> CT <u>AGATCGCCAC</u> CT <u>GAGTCG</u> 3'
tlr1999-GAF	P9: 5'CC <u>CGAATT</u> CC <u>CTCA</u> CC <u>CTAAC</u> CT <u>GCTG</u> 3'
	P10: 5'CG <u>CGTCGAC</u> TT <u>GGTAA</u> AT <u>GGT</u> 3'

注:表中带下划线的碱基序列为添加的限制性内切酶的酶切位点。  
Note: Introduced endonuclease sites are underlined.

5'端分别引入不同的限制性内切酶位点以及 3 个保护碱基。

#### 1.4 质粒的克隆和重组菌株的构建

来源于嗜热藻 (*T. elongatus* BP-1) 的基因组总 DNA 作为模板, 用表 1 中相应的引物分别采用降落 PCR 扩增出目的片段, 然后将合成片段直接连接到表达载体 pET30a(+) , 转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 在含有卡那霉素的平板上筛选阳性克隆子。根据质粒酶切图谱初步确定阳性克隆子后, 将初步鉴定正确的菌种进行测序。

质粒 pACYCDuet-ho1-pcyA 中的两个基因的表达产物为血红素氧化酶和胆绿素还原酶, 在这两种酶的作用下, 大肠杆菌体内的血红素被逐步催化生成 PCB。

将表达载体 pET-tlr0911-GAF、pET-tlr1215-GAF1、pET-tlr1215-GAF2 和 pET-tlr1999-GAF 分别与可以产生 PCB 的质粒 pACYCDuet-ho1-pcyA 共同转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 用含有卡那霉素和氯霉素的平板筛选重组菌株。

#### 1.5 在大肠杆菌中蛋白质的表达和提纯

表达载体 pET30a(+) 的 T7 启动子下游含有 6 个组氨酸的密码子, 由此构建的质粒在大肠杆菌中诱导表达得到的外源融合蛋白 N 端都带有 His-tag 标签, 故可采用镍离子亲和层析法进行提纯。

将重组菌株接种在含有 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素和 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素的 300 mL LB 培养基中, 37°C 培养至  $\text{OD}_{600\text{ nm}} = 0.5 \sim 0.6$ , 置于冰水混合物里冰浴 30 ~ 60 min, 加入终浓度为 1  $\text{mmol}/\text{L}$  的 IPTG, 摆床转速设置为 150  $\text{r}/\text{min}$ , 在黑暗条件下 20°C 诱导表达 12 h。离心 5 min (6500  $\text{r}/\text{min}$ , 4°C) 收集细胞, 蒸馏水洗涤细胞 2 次, 尽可能洗去残留的培养液, 然后用 5 mL Start Buffer 缓冲液 (500  $\text{mmol}/\text{L}$  NaCl, 20  $\text{mmol}/\text{L}$  磷酸钾缓冲液, pH 7.2) 重悬细胞, 用超声波细胞破碎仪超声破碎 100 次 (功率 200 W), 细胞匀浆离心 30 min (10000  $\text{r}/\text{min}$ , 4°C) 得到澄清的上清液。将重组蛋白上清液加入镍离子亲和层析柱, 先用 3 倍柱体积的 Start Buffer 平衡层析柱, 然后采用含 50  $\text{mmol}/\text{L}$  咪唑的 Buffer 洗脱杂蛋白, 最后收集重组蛋白采用含 500  $\text{mmol}/\text{L}$  咪唑的 Buffer。提纯产物用透析液 (50  $\text{mmol}/\text{L}$  磷酸钾缓冲液, 500  $\text{mmol}/\text{L}$  NaCl, pH 7.2) 透析过夜, 以去除咪唑, 消除咪唑对重组蛋白的影响。

#### 1.6 重组蛋白 SDS-PAGE 和锌荧光实验

从提纯的蛋白质溶液中取出 20  $\mu\text{L}$ , 按照 1 : 1 的比例向蛋白质样品中加入上样缓冲液和巯基乙醇 (9 : 1), 混合均匀后, 置 100°C 沸水中煮沸 10 min, 制成聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 蛋白质样品。电泳前, 要先将样品离心 30 min (9000  $\text{r}/\text{min}$ , 4°C), 弃沉淀取上清液, 用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE。因要做锌荧光实验, 将蛋白胶置于 1.5 mol/L 醋酸锌溶液里至被浸没, 室温黑暗中染色 5 min 后, 用 Bio-rad 电泳凝胶成像系统分析并照相。醋酸锌染色完成之后改用考马斯亮蓝 R250 染色, 脱色完全后用凝胶成像系统分析并照相。

#### 1.7 光谱分析

采用 DU-800 紫外可见光谱仪测取吸收光谱, 狹缝宽度为 1.0 nm, 扫描速度为 800 nm/min, 扫描范围是 200 ~ 800 nm。荧光光谱采用 Perkin-Elmer LS-55 型荧光光谱仪测定, 狹缝宽度为 10.0 nm, 扫描速度为 1000 nm/min, 扫描范围是 300 ~ 800 nm。

在蓝光照射时, 是来自卤素灯的光线透过一个  $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ 、半带宽 = 7.5 nm 的干涉滤光器。在青光照射时, 是来自卤素灯的光线透过一个  $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$ 、半带宽 = 7.5 nm 的干涉滤光器。在绿光照射时, 是来自卤素灯的光线透过一个  $\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$ 、半带宽 = 7.5 nm 的干涉滤光器。在红光照射时, 是来自卤素灯的光线透过一个  $>610 \text{ nm}$  的截止型滤光器。

#### 1.8 重组蛋白变性实验

为了确定重组蛋白结合藻胆色素的种类, 需要进行酸性尿素 (8 mol/L, pH 2.0) 变性实验。在变性条件下, 脱辅基蛋白和藻胆色素的结合松散, 藻胆色素基本上呈游离状态, 重组蛋白的吸收光谱和游离藻胆色素的吸收光谱很相似, 可以从其吸收特征峰的位置确定藻胆色素的种类。通常情况下, 取 400  $\mu\text{L}$  透析蛋白样品, 加入 0.36 g 尿素和 32  $\mu\text{L}$  的浓盐酸, 充分混匀后, 黑暗中 4°C 反应 30 min, 离心 30 min (9000  $\text{r}/\text{min}$ , 4°C), 取上清液测其吸收光谱。

### 2 结果与分析

#### 2.1 蓝细菌光敏色素结构域分析

根据 SMART 模块分析结构域可知 (见图 1),

Tlr0911 和 Tlr1999 均包括 1 个蓝细菌光敏色素 GAF 结构域,而 Tlr1215 含有 2 个 GAF 结构域,将氨基酸序列为 28~180 位的 GAF 结构域命名为 Tlr1215-GAF1,而将氨基酸序列为 323~470 位的 GAF 结构域命名为 Tlr1215-GAF2。GAF 结构域作为蓝细菌光敏色素的感光区域,其它的信号传导结构域包括 EAL 结构域、GGDEF 结构域、组氨酸激酶 (HisKA + HATPase\_c) 结构域。

通过将 Tlr0911、Tlr1215 和 Tlr1999 的 GAF 结构域的氨基酸序列与已经发现的蓝细菌光敏色素 TePixJ 和 TeTlr0924 的氨基酸序列比对,发现 Tlr0911 和 Tlr1999 的 GAF 结构域均包括 1 个保守的[D/E]XCF 模块和 CH 残基。

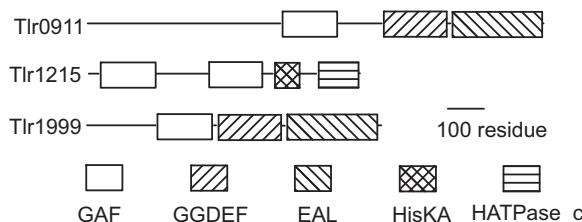


图 1 根据 SMART 模块分析得到的 Tlr0911、Tlr1215 和 Tlr1999 的结构域组成

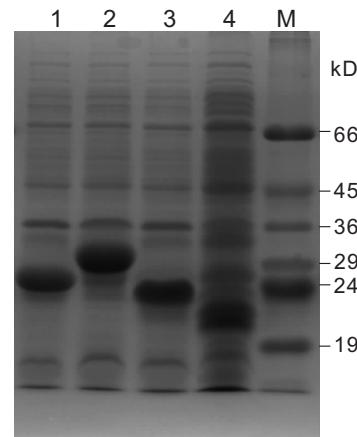
Fig. 1 Domain architecture of Tlr0911, Tlr1215 and Tlr1999 obtained according to motif analysis by SMART

## 2.2 克隆质粒构建和重组菌株表达的鉴定

参照 1.3 和 1.4 中实验方法构建得到的质粒用设计引物时引入的限制性内切酶做双切检测,质粒 pET-tlr0911-GAF、pET-tlr1215-GAF1、pET-tlr1215-GAF2 和 pET-tlr1999-GAF 酶切后得到的片段理论大小依次为 513、435、426、669 bp,根据质粒酶切图谱初步确定阳性克隆子,选定测序正确的菌株。然后参照 1.4、1.5 和 1.6 中的实验方法,将重组菌株表达后,取 1 mL 细胞制取蛋白样品,用 SDS-PAGE 分离检测,从考马斯亮蓝 R250 染色的结果可以直观地看到目的蛋白的表达。脱辅基蛋白 Tlr0911-GAF、Tlr1215-GAF1、Tlr1215-GAF2 和 Tlr1999-GAF 的大小分别为 24.85、22.02、21.79、31.58 kD,聚丙烯酰胺凝胶电泳条带大小与预期符合(图 2)。

## 2.3 重组蛋白的吸收光谱和荧光光谱分析

参照 1.5 中的实验方法,得到在大肠杆菌体内诱导表达的重组蛋白。通过吸收光谱和荧光光谱检



1. Tlr0911-GAF 细胞样品; 2. Tlr1999-GAF 细胞样品; 3. Tlr1215-GAF1 细胞样品; 4. Tlr1215-GAF2 细胞样品; M. 蛋白质标准分子量。

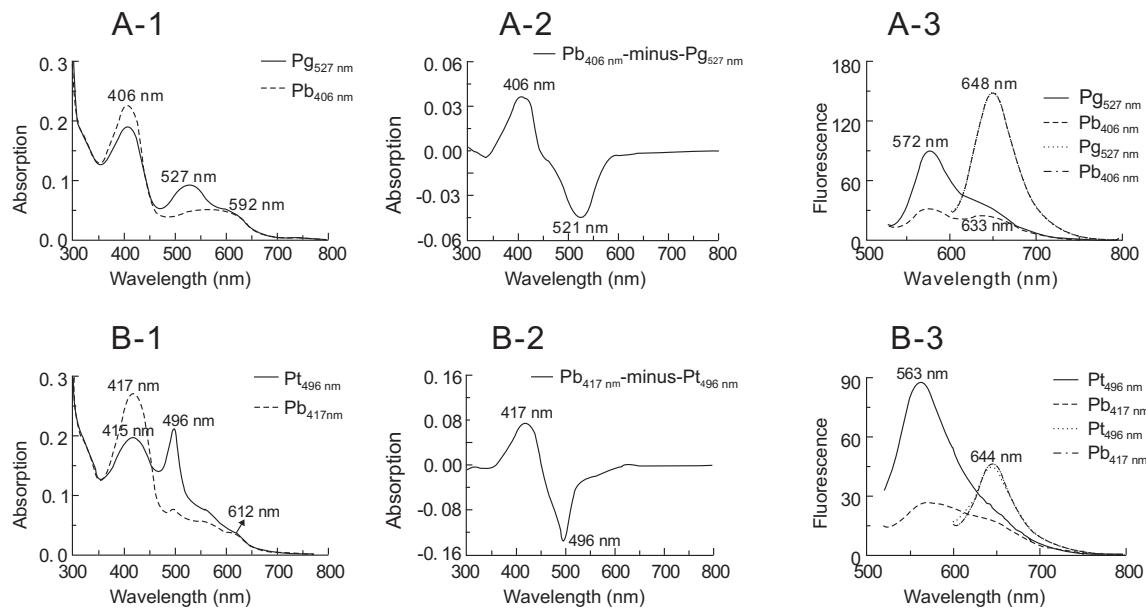
1. Tlr0911-GAF expressed in *E. coli*; 2. Tlr1999-GAF expressed in *E. coli*; 3. Tlr1215-GAF1 expressed in *E. coli*; 4. Tlr1215-GAF2 expressed in *E. coli*; M. Marker proteins.

图 2 细胞中重组蛋白的考马斯亮蓝染色电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE stained with Coomassie blue of recombinant proteins from cell

测各体内重组体系得到的重组蛋白,由其光谱特征可判断重组蛋白的光学活性以及偶联色素的种类等。

Tlr0911-GAF 从大肠杆菌细胞中提纯后,得到可溶的均质的蛋白质溶液。纯化的 Tlr0911-GAF 在蓝光的照射下,它的吸收光谱有 2 个明显的吸收峰(见图 3: A-1),其最大吸收峰分别位于 406 nm 和 527 nm,这个光吸收状态被命名为 Pg<sub>527 nm</sub>;当 Pg<sub>527 nm</sub> 被绿光照射后,最大吸收峰位于 406 nm 处的吸收峰值上升,而 527 nm 处的吸收峰几乎消失,这个光吸收状态被命名为 Pb<sub>406 nm</sub>。在这 2 个光吸收状态的吸收光谱中,在 592 nm 处有 1 个小的吸收峰,它不受光照的影响。在 Pb/Pg 型的蓝细菌光敏色素 TePixJ 和 TeTlr0924 的吸收光谱中也检测到 1 个光钝化峰。在 Pg<sub>527 nm</sub> 转换为 Pb<sub>406 nm</sub> 时,它的吸收光谱在 406 nm 处吸收值上升至最高,在 521 nm 处吸收值下降至最低(见图 3: A-2 中吸收差减光谱)。Pg<sub>527 nm</sub> 共有 2 个荧光发射峰,其最大荧光发射峰值分别位于 572 nm 和 648 nm; Pb<sub>406 nm</sub> 共有 2 个荧光发射峰,它有 1 个位于 572 nm 和 633 nm 的双荧光发射峰,此位置荧光发射峰的高低随着吸收峰的高低变化而变化,而它位于 648 nm 的荧光发射峰与 Pg<sub>527 nm</sub> 的荧光发射峰高低几乎一致(见图 3: A-3 中荧光发射光谱)。因此得出结论:



A-1: Tlr0911-GAF 的吸收光谱; A-2: Tlr0911-GAF 的  $Pb_{406\text{ nm}}$  差减  $Pg_{527\text{ nm}}$  的吸收差减光谱; A-3: Tlr0911-GAF 的荧光发射光谱; B-1: Tlr1999-GAF 的吸收光谱; B-2: Tlr1999-GAF 的  $Pb_{417\text{ nm}}$  差减  $Pt_{496\text{ nm}}$  的吸收差减光谱; B-3: Tlr1999-GAF 的荧光发射光谱。

A-1: Absorption spectra of  $Pg_{527\text{ nm}}$  and  $Pb_{406\text{ nm}}$  of Tlr0911-GAF; A-2: Difference absorption spectrum of  $Pb_{406\text{ nm}}$ -minus- $Pg_{527\text{ nm}}$  of Tlr0911-GAF; A-3: Fluorescence emission spectra of  $Pg_{527\text{ nm}}$  and  $Pb_{406\text{ nm}}$  of Tlr0911-GAF; B-1: Absorption spectra of  $Pt_{496\text{ nm}}$  and  $Pb_{417\text{ nm}}$  of Tlr1999-GAF; B-2: Difference absorption spectrum of  $Pb_{417\text{ nm}}$ -minus- $Pt_{496\text{ nm}}$  of Tlr1999-GAF; B-3: Fluorescence emission spectra of  $Pt_{496\text{ nm}}$  and  $Pb_{417\text{ nm}}$  of Tlr1999-GAF.

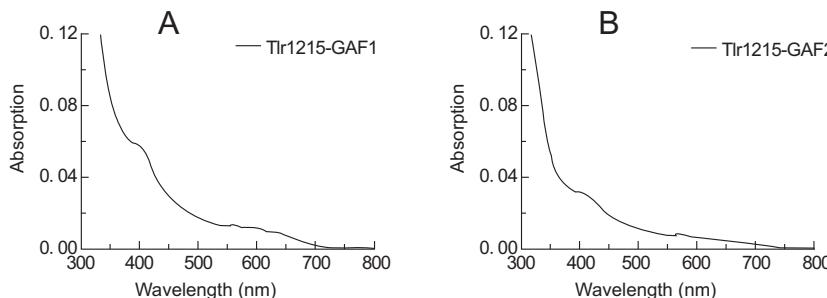
图 3 Tlr0911-GAF 和 Tlr1999-GAF 的吸收光谱和荧光发射光谱  
Fig. 3 Absorption and fluorescence emission spectra of Tlr0911-GAF and Tlr1999-GAF

527 nm 处的吸收峰产生 572 nm 处的荧光发射峰, 而 648 nm 处的荧光发射峰是由不受光照影响的 592 nm 处的吸收峰产生的。光转换在绿光吸收状态  $Pg_{527\text{ nm}}$  和蓝光吸收状态  $Pb_{406\text{ nm}}$  之间是可逆的。相比其它已知的 Pb 型蓝细菌光敏色素,  $Pb_{406\text{ nm}}$  的吸收峰蓝移了 20 nm 左右。

Tlr1999-GAF 的吸收光谱和荧光发射光谱与 Tlr0911-GAF 的光谱性质大致上是一致的(见图 3: B-1、B-2 和 B-3)。在蓝光照射后, 它的吸收光谱有 2 个明显的吸收峰, 其最大吸收峰分别位于 415 nm 和 496 nm, 这个光吸收状态被命名为  $Pt_{496\text{ nm}}$ ; 当  $Pt_{496\text{ nm}}$  被绿光照射后, 最大吸收峰位于 417 nm 处的吸收峰值上升, 相比  $Pt_{496\text{ nm}}$  的对应吸收峰红移了 2 nm, 而 496 nm 处的吸收峰几乎消失, 这个光吸收状态被命名为  $Pb_{417\text{ nm}}$ 。类似于 Tlr0911-GAF 在 592 nm 有 1 个光钝化峰, Tlr1999-GAF 的 2 个光吸收状态的吸收光谱中, 在 612 nm 处有 1 个小的吸收峰, 它同样不受光照的影响。在  $Pt_{496\text{ nm}}$  转换为  $Pb_{417\text{ nm}}$  时, 它的吸收光谱在 417 nm 处吸收值上升

至最高, 在 496 nm 处吸收值下降至最低(见图 3: B-2 中吸收差减光谱)。 $Pt_{496\text{ nm}}$  共有 2 个荧光发射峰, 其最大荧光发射峰值位于 563 nm 和 644 nm;  $Pb_{417\text{ nm}}$  共有 2 个荧光发射峰, 它位于 563 nm 的荧光发射峰的高低随着吸收峰的高低变化, 而它位于 644 nm 的荧光发射峰与  $Pt_{496\text{ nm}}$  的荧光发射峰的高低基本上是一致的(见图 3: B-3 中荧光发射光谱)。根据以上 Tlr1999-GAF 的光谱性质得出结论: 496 nm 处的吸收峰产生 563 nm 处的荧光发射峰, 而 644 nm 处的荧光发射峰是由不受光照影响的 612 nm 处的吸收峰产生的。在青光吸收状态  $Pt_{496\text{ nm}}$  和蓝光吸收状态  $Pb_{417\text{ nm}}$  之间存在可逆的光转换。值得注意的是,  $Pt_{496\text{ nm}}$  的吸收峰是目前所有已经发现的蓝细菌光敏色素里峰形最尖锐的, 并且它的吸收峰相比其它已知的 Pg 型的蓝细菌光敏色素蓝移了约 30 nm。

从图 4 可以看出, Tlr1215-GAF1 和 Tlr1215-GAF2 的吸收光谱没有特征性的吸收峰, 它们不能自发和藻胆色素结合。



A: Tlr1215-GAF1 的吸收光谱; B: Tlr1215-GAF2 的吸收光谱。  
A: Absorption spectrum of Tlr1215-GAF1; B: Absorption spectrum of Tlr1215-GAF2.

图 4 Tlr1215-GAF1 和 Tlr1215-GAF2 的吸收光谱  
Fig. 4 Absorption spectra of Tlr1215-GAF1 and Tlr1215-GAF2

## 2.4 重组蛋白变性实验结果

参照 1.8 中的实验方法,将上述有光活性的蓝细菌光敏色素 Tlr0911-GAF 和 Tlr1999-GAF 不同的光吸收状态分别做酸性尿素变性实验。

酸性尿素变性的绿光吸收状态  $Pg_{527\text{ nm}}$  吸收光谱有 2 个吸收峰位于 560 nm 和 655 nm,因为光照射后重组蛋白 Tlr0911-GAF 的蛋白质结构发生了改变,导致与它连接的藻胆色素的空间构象发生了扭曲,在变性条件下,藻胆色素呈现游离状态,但是扭曲的构象无法恢复到天然构象,导致吸收峰出现异常(见图 5: A-1, A-2)。经绿光照射后,它的吸收特征峰则恢复到 597 nm 和 661 nm,因此可知  $Pg_{527\text{ nm}}$  中共结合了两种不同的藻胆色素,即藻紫胆素 PVB 和藻蓝胆素 PCB。酸性尿素变性的蓝光吸收状态  $Pb_{406\text{ nm}}$  吸收光谱的吸收特征峰和游离的 PVB 及 PCB 的吸收光谱是吻合的。根据上述的光谱特征可以准确地得知, Tlr0911-GAF 共价的结合着 PVB 和 PCB,且它的构型在  $Pg_{527\text{ nm}}$  是包含着 C15-E 的藻胆色素,在  $Pb_{406\text{ nm}}$  是包含着 C15-Z 的藻胆色素,这与之前所发现的 Pb/Pg 型蓝细菌光敏色素 TePixJ 是一样的。

Tlr1999-GAF 同 Tlr0911-GAF 一样,也共价结合着 PVB 和 PCB(见图 5: B-1, B-2),并且它们的空间构型也是一致的,青光吸收状态  $Pt_{496\text{ nm}}$  是包含着 C15-E 的藻胆色素,蓝光吸收状态  $Pb_{417\text{ nm}}$  是包含着 C15-Z 的藻胆色素。

Tlr0911-GAF 和 Tlr1999-GAF 的变性吸收光谱特征,解释了  $Pg_{527\text{ nm}}$  和  $Pb_{406\text{ nm}}$  与  $Pt_{496\text{ nm}}$  和  $Pb_{417\text{ nm}}$  之间的可逆光转换现象是由光驱动而引起与脱辅基蛋白共价结合藻胆色素的 C15/16 双键的 Z/E 异

构造成的。

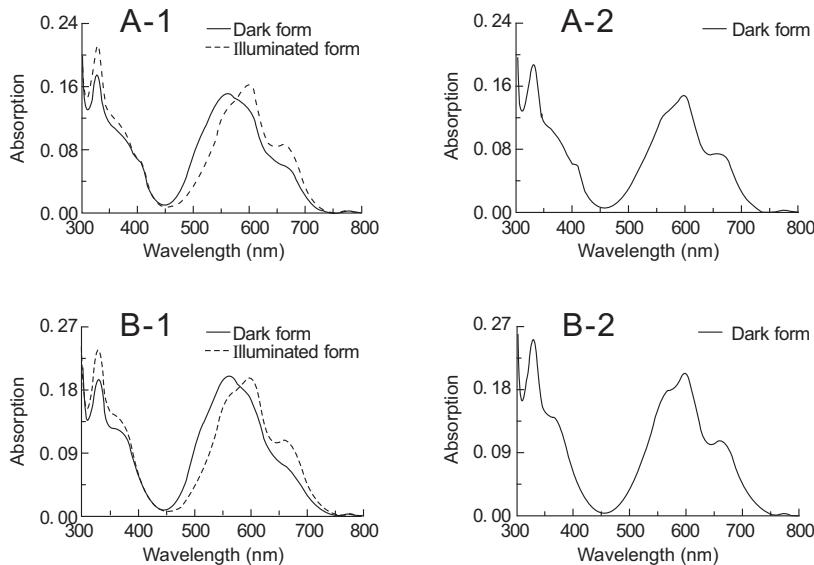
## 2.5 重组蛋白的 SDS-PAGE 和锌荧光实验结果

参照 1.6 中的实验方法,在聚丙烯酰胺凝胶电泳后,通过醋酸锌染色和考马斯亮蓝 R250 染色,可检测到目的蛋白的表达(见图 6)。藻胆色素可与  $Zn^{2+}$  形成螯合物,在一定波长光激发下可发射荧光。通过重组蛋白的锌荧光实验,可以发现在紫外光照射下,电泳条带中重组蛋白发出荧光,这证明在体内重组过程中脱辅基蛋白和藻胆色素是共价偶联的,这和酸性尿素变性实验的结果是吻合的。

## 3 讨论

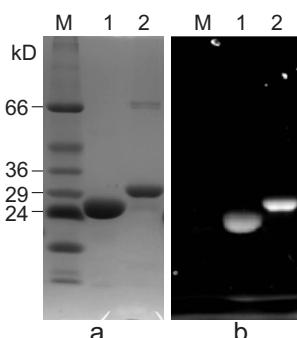
在本实验中,从嗜热藻(*T. elongatus* BP-1)中共找到 3 个基因,通过结构域分析推测,它们可能是蓝细菌光敏色素。通过实验验证, Tlr0911-GAF 存在蓝光吸收态  $Pb_{406\text{ nm}}$  和绿光吸收态  $Pg_{527\text{ nm}}$  之间的可逆光转换,它可共价结合 2 种藻胆色素 PVB 和 PCB, Tlr1999-GAF 则存在蓝光吸收态  $Pb_{417\text{ nm}}$  和青光吸收态  $Pt_{496\text{ nm}}$  之间的可逆光转换,它同样共价结合 PVB 和 PCB。而 Tlr1215-GAF1 和 Tlr1215-GAF2 不能自发结合藻胆色素,不具有光活性。

令人惊奇的是,本实验还发现了 2 个新型的蓝细菌光敏色素 Tlr0911-GAF 和 Tlr1999-GAF,相比其它已知的 Pb 型蓝细菌光敏色素,  $Pb_{406\text{ nm}}$  的吸收峰蓝移了 20 nm 左右,  $Pt_{496\text{ nm}}$  的吸收峰是所有已经发现的蓝细菌光敏色素里峰形最尖锐的,并且它的吸收峰相比其它已知的 Pg 型的蓝细菌光敏色素蓝移了约 30 nm。它们进一步扩大了蓝细菌光敏色素多变的光谱特性,提供了一个关于蓝细菌光敏色素的光化学性质的新认识。



A-1: 变性的 Tlr0911-GAF 的  $\text{Pg}_{527 \text{ nm}}$  的吸收光谱; A-2: 变性的 Tlr0911-GAF 的  $\text{Pb}_{406 \text{ nm}}$  的吸收光谱; B-1: 变性的 Tlr1999-GAF 的  $\text{Pt}_{496 \text{ nm}}$  的吸收光谱; B-2: 变性的 Tlr1999-GAF 的  $\text{Pb}_{417 \text{ nm}}$  的吸收光谱。  
 A-1: Absorption spectra of denatured  $\text{Pg}_{527 \text{ nm}}$  of Tlr0911-GAF; A-2: Absorption spectrum of denatured  $\text{Pb}_{406 \text{ nm}}$  of Tlr0911-GAF; B-1: Absorption spectra of denatured  $\text{Pt}_{496 \text{ nm}}$  of Tlr1999-GAF; B-2: Absorption spectrum of denatured  $\text{Pb}_{417 \text{ nm}}$  of Tlr1999-GAF.

图5 变性的 Tlr0911-GAF 和 Tlr1999-GAF 的吸收光谱  
 Fig. 5 Absorption spectra of denatured Tlr0911-GAF and Tlr1999-GAF



1. Tlr0911-GAF 的锌荧光 (b) 和考马斯亮蓝 (a) 染色凝胶电泳图;  
 2. Tlr1999-GAF 的锌荧光 (b) 和考马斯亮蓝 (a) 染色凝胶电泳图;  
 M: 蛋白质标准分子量。

1. SDS-PAGE stained with zinc-induced fluorescence (b) and Coomassie blue (a) of Tlr0911-GAF; 2. SDS-PAGE stained with zinc-induced fluorescence (b) and Coomassie blue (a) of Tlr1999-GAF; M: Protein markers.

图6 Tlr0911-GAF 和 Tlr1999-GAF 的锌荧光和考马斯亮蓝染色凝胶电泳图

Fig. 6 SDS-PAGE stained with zinc-induced fluorescence and Coomassie blue of Tlr0911-GAF and Tlr1999-GAF

蓝细菌光敏色素作为脱辅基蛋白在大肠杆菌体内与作为辅基的藻胆色素共表达生成重组蛋白, 在这个实验中加入的是可以生成藻蓝胆素 PCB 的质粒 pACYCDuet-ho1-pcyA, 但是 Tlr0911-GAF 和 Tlr1999-GAF 所结合的辅基色素均有 2 种, 即藻紫

胆素 PVB 和藻蓝胆素 PCB, 而 PVB 是 PCB 的同分异构体。

到目前为止, PVB 只在一些丝状蓝藻的藻红蛋白的  $\alpha$  亚基中出现过, 未曾发现 PVB 的生物合成酶。*Mastigocladus laminosus* 中的 PecE/F 蛋白可以在藻红蛋白的  $\alpha$  亚基与 PCB 体外重组时将 PCB 异构为 PVB<sup>[12-14]</sup>。如文献 9 中报道, Ikeuchi 等将 TePixJ 的 GAF 结构域与 PCB 在大肠杆菌体内共表达, 最后得到的重组蛋白所结合的色素是 PCB 与 PVB 的混合体。将 TePixJ 的 GAF 结构域单独表达, 与单独表达得到的 PCB 进行体外重组实验, 可以很清楚地看到 PCB 与 GAF 结构域的共价偶联在几分钟之内完成, 结合在 GAF 结构域上的 PCB 再缓慢地异构为 PVB。该实验表明 TePixJ 的 GAF 结构域具有 3 个功能: 自催化裂合酶、自催化异构酶、光致异构化, 但是这些功能的实现还需要蓝细菌中其他因子的辅助。由此可以得知, Tlr0911 和 Tlr1999 的 GAF 结构域可能也具有这 3 个功能。

根据之前的相关报道所知, GAF 结构域内保守的半胱氨酸 Cys 通过硫醚键共价结合藻胆色素发色团, 这个保守的 Cys 称之为色素结合位点, 而对

于Pb/Pg型可逆光转换的蓝细菌光敏色素中位于[D/E]XCF模块中的Cys的具体作用机理还没有被明确阐明,关于Cys的作用目前有两个相反的模型,光可逆结合模型和稳定双键模型。在接下来的实验中,主要致力于这两个Pb/Pg型蓝细菌光敏色素中Cys的具体机理的研究。

在植物光敏色素的研究中,比较困难的问题在于缺少简单的光敏色素模型,同时还必须考虑到植物体内各种光敏色素及其它光受体的相互作用。与植物光敏色素相比,蓝细菌光敏色素的分子结构更加简单,制备也更为方便,是深入研究光敏色素对植物发育调控的理想材料。

## 参考文献:

- [1] Rockwell N C, Su Y S, Lagarias J C. Phytochrome structure and signaling mechanisms [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 837–858.
- [2] Quail P H. Phytochrome photosensory signalling networks [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 85–93.
- [3] Rockwell N C, Lagarias J C. A brief history of phytochromes [J]. *Chemphyschem*, 2010, 11: 1172–1180.
- [4] Ikeuchi M, Ishizuka T. Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2008, 7: 1159–1167.
- [5] Hughes J. Phytochrome three-dimensional structures and functions [J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38: 710–716.
- [6] Rockwell N C, Njuguna S L, Roberts L, Castillo E, Parson V L, Dwojak S, Lagarias J C, Spiller S C. A second conserved GAF domain cysteine is required for the blue/green photoreversibility of cyanobacteriochrome Tlr0924 from *Thermosynechococcus elongatus* [J]. *Biochemistry*, 2008, 47: 7304–7316.
- [7] Yoshihara S, Shimada T, Matsuoka D, Zikihara K, Kohchi T, Tokutomi S. Reconstitution of blue-green reversible photoconversion of a cyanobacterial photoreceptor, PixJ1, in *phycocyanobilin-producing Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 2006, 45: 3775–3784.
- [8] Ishizuka T, Narikawa R, Kohchi T, Katayama M, Ikeuchi M. Cyanobacteriochrome TePixJ of *Thermosynechococcus elongatus* harbors phycoviolobilin as a chromophore [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 1385–1390.
- [9] Ishizuka T, Shimada T, Okajima K, Yoshihara S, Ochiai Y, Katayama M, Ikeuchi M. Characterization of cyanobacteriochrome TePixJ from a thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1 [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 1251–1261.
- [10] Schmitz O, Katayama M, Williams S B, Kondo T, Golden S S. CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock [J]. *Science*, 2000, 289: 765–768.
- [11] Letunic I, Copley R R, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P. SMART 5: domains in the context of genomes and networks [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 257–260.
- [12] Storf M, Parbel A, Meyer M, Strohmann B, Scheer H, Deng M G, Zheng M, Zhou M, Zhao K H. Chromophore attachment to biliproteins: specificity of PecE/PecF, a lyase-isomerase for the photoactive 3(1)-cys-alpha 84-phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin [J]. *Biochemistry*, 2001, 40: 12444–12456.
- [13] Zhao K H, Wu D, Zhou M, Zhang L, Bohm S, Bubenzer C, Scheer H. Amino acid residues associated with enzymatic activities of the isomerizing phycoviolobilin-lyase PecE/F [J]. *Biochemistry*, 2005, 44: 8126–8137.
- [14] Bohm S, Endres S, Scheer H, Zhao K H. Biliprotein chromophore attachment: chaperone-like function of the PecE subunit of alpha-phycoerythrocyanin lyase [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 25357–25366.